



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07322891 A**(43) Date of publication of application: **12.12.95**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02
/(C12Q 1/02 , C12R 1:865)

(21) Application number: **06116622**(22) Date of filing: **30.05.94**(71) Applicant: **TONEN CORP**

(72) Inventor:
TANIDA MOCHIMASA
HASEGAWA AKIRA
OYA TEIICHI
ANRAKU YASUHIRO

(54) **METHOD FOR SCREENING**
IMMUNOSUPPRESSIVE SUBSTANCE

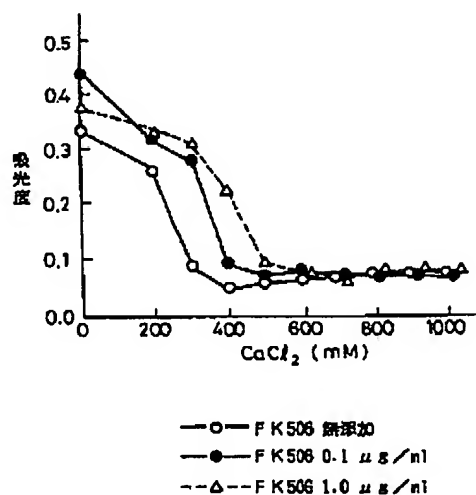
(57) Abstract:

PURPOSE: To simply screen an immunosuppressive substance by inoculating a calcineurin-active yeast into a medium having a Ca concentration not enabling the multiplication of the calcineurin-active yeast and enabling the multiplication of other yeasts not having the activity, and subsequently culturing an examination specimen on the medium.

CONSTITUTION: A calcineurin-active enzyme strain (e.g. *Saccharomyces cerevisiae* YPH 499 strain) is inoculated into a medium having a calcium concentration not enabling the multiplication of the calcineurin-active enzyme strain but enabling the multiplication of calcineurin activity-defective yeasts, and an examination sample is added to the medium and subsequently cultured. When the yeast strain multiplies, it is estimated that an immunosuppressive substance is contained in the examination sample, thus the immunosuppressive substance is screened. A yeast wild strain YPH499 multiplies in the presence of 200mM CaCl_2 , but does not multiply in the presence of 300mM CaCl_2 . The multiplication of the yeast in the presence

of an immunosuppressive substance (e.g. FK506) is recognized by the increase of absorbance.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-322891

(43) 公開日 平成7年(1995)12月12日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/02		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/02				
C 1 2 R 1:865)				

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-116622

(22) 出願日 平成6年(1994)5月30日

(71) 出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(72) 発明者 谷田 以誠

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 長谷川 明

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 大矢 禎一

東京都荒川区東尾久6-35-8 ネオコーポ町屋805

(74) 復代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

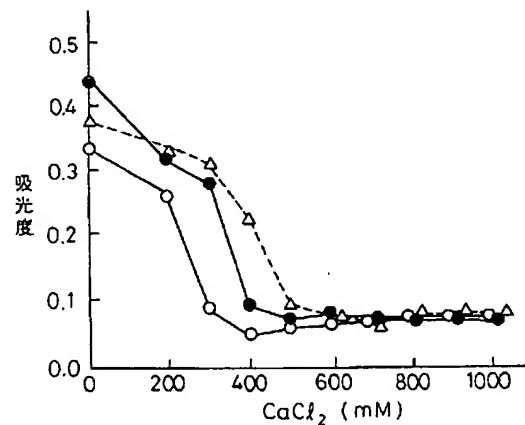
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫抑制物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【目的】 免疫抑制物質をスクリーニングするための簡便な方法の提供。

【構成】 所定濃度のカルシウムを含有する培地に被験サンプルを添加して、カルシニューリン活性を有する酵母（野性型株）を培養し、その酵母の増殖が生ずる場合に該被験サンプルが免疫抑制物質を含有するものと推定する。



—○— F K 506 無添加
—●— F K 506 0.1 μg/ml
--△-- F K 506 1.0 μg/ml

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルシニューリン活性を有する酵母株は増殖しないがカルシニューリン活性が欠損した酵母株が増殖し得る濃度のカルシウムを含有する培地に、カルシニューリン活性を有する酵母株を接種し、且つ被験サンプルを添加し、培養した後、該酵母株が増殖した場合には該被験サンプル中に免疫抑制物質が存在するものと推定する、ことを特徴とする免疫抑制物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母を用いる簡便な免疫抑制物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 免疫抑制物質は、臓器移植における拒絶反応の抑制、自己免疫疾患や他の免疫学的機序が関与する様々な疾患の予防や治療のために重要な物質であり、多くの免疫抑制物質が知られている。特に、サイクロスポリンA (CsA) 及びFK506は免疫系細胞に特異的に作用し、免疫応答の要であるT細胞の活性化の初期段階で効果をあらわし、すでに確立された抗体産生などには影響を与えないものとして重要である。

【0003】 CsA及びFK506が免疫抑制効果を現わす機序としては、CsA又はFK506は、それらの細胞内受容体であるそれぞれサイクロフィリン (Cyp-18) 又はFK506結合蛋白質 (FKBP-12) と結合して、それぞれCsA-Cyp複合体又はFK506-FKBP複合体を形成し、これらの複合体が共通に結合する物質である蛋白質セリン/スレオニン脱リン酸化酵素カルシニューリンと結合し、これによってカルシニューリンの活性を阻害することにより免疫抑制効果が現われると推定されている。

【0004】 酵母細胞においても、FK506やCsAに対する結合蛋白質をコードする遺伝子の同族体（それぞれ、FKB1及びCYP1と称する）が単離されており、これらの遺伝子が破壊された細胞についても解析が行われているが、この遺伝子破壊が酵母の細胞増殖に本質的な欠陥を与えることは観察されていない。

【0005】 また、カルシニューリンについては、それをコードする遺伝子としてCNB1（調節サブユニットをコードする）、CNA1（触媒サブユニット1をコードする）及びCNA2（触媒サブユニット2をコードする）が単離されており、これらを用いて作製したカルシニューリン活性欠損株においては、 α ファクターによるG1期停止からの回復に欠損があること (Cyert, M. S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, 7376-7380 (1991); Cyert, M. S. ら, Mol. Cell. Biol. Vol. 12, 3460-3469 (1992); Foor, F. ら, Nature, Vol. 36

0, 682-684 (1992)), 及び1.2M NaClに感受性であること (Nakamura T. ら, EMBO J. Vol. 12, 4063-4071 (1993))が報告されている。

【0006】 しかしながら、酵母におけるカルシウムとカルシニューリンとの関係については報告されていない。本発明者らは、培地中のカルシウム濃度と酵母の増殖との関係を研究する過程で、通常は酵母が増殖し得ない高濃度のカルシウムを含有する培地においても、それに免疫抑制物質であるCsA又はFK506を添加した場合にはその培地中で酵母が増殖し得るという全く新しい知見を得、さらにこの現象において、免疫抑制物質がその効果を発揮する過程に介在するカルシニューリンが関与していることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

【発明が解決しようとする課題及び該課題を解決するための手段】 従って、本発明は、前記の新規な知見に基づいて、免疫抑制物質の簡便なスクリーニング方法を提供しようとするものである。すなわち、本発明は、カルシニューリン活性を有する酵母株は増殖しないがカルシニューリン活性が欠損した酵母株が増殖し得る濃度のカルシウムを含有する培地に、カルシニューリン活性を有する酵母株を接種し、且つ被験サンプルを添加し、培養した後、該酵母株が増殖した場合には該被験サンプル中に免疫抑制物質が存在するものと推定することを特徴とする免疫抑制物質のスクリーニング方法を提供する。

【0008】 前記カルシニューリン活性を有する酵母株の好ましい例としてサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) YPH499株が挙げられる。また、前記カルシウム濃度の好ましい例は600mMである。

【0009】

【具体的な説明】 本発明においてカルシニューリン活性を有する酵母株とは、破壊されていないカルシニューリン遺伝子を有する酵母株を意味し、「野性株」と称する場合もある。この意味において、多くの酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属に属する多くの酵母、例えば多くのサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 種に属する株が野性株である。

【0010】 従って、本発明におけるカルシニューリン活性を有する酵母株、すなわち野性株は、一般の実験室や研究室において常用されている酵母株の中から任意に選択することができ、また種々の微生物寄託機関に保管されており、特に制限なく分譲され得る酵母株から選択して用いることができる。従って、本発明においては、Yeast Genetic Stock Centerに保管されており、自由に分譲され得るサッカロミセス・セレビシエS288C株に由来するYPH499株 (Sikorski and Hieter, Gen

etics, Vol. 122, 19-27, (1989))を例として用いるが、これに限定されるものではない。

【0011】本発明において、カルシニューリン活性を欠損した酵母株（本発明において変異株と称する）とは、活性なカルシニューリンを産生し得ない酵母株であり、例えばカルシニューリン遺伝子が自然に又は人為的に変異した株、あるいはカルシニューリン遺伝子を破壊した株である。前記の意味における変異株は、カルシニューリン遺伝子を人為的に破壊することにより容易に得られる。

【0012】例えば、カルシニューリンをコードする遺伝子、例えばカルシニューリンの調節サブユニット遺伝子の塩基配列はCyerら、Mol. Cell. Biol. Vol. 12, 3460-3469 (1992)により知られているから、この既知の塩基配列に基づいて一対のプライマーを調製し、鋳型DNAとして野性株のゲノム性DNAを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによりカルシニューリン遺伝子又はその一部分をコードするDNAを増幅することができる。次に、この増幅生成物からカルシニューリン遺伝子又はその部分を切り出し、適当なクローニングベクター、例えばpGEM-T（Promega社）等にクローニングする。次に、適当な制限酵素で処理することにより前記カルシニューリン遺伝子又はその一部分の内部を切断し、次にこの切断部分に任意のDNA断片を挿入することによりカルシニューリン遺伝子を破壊する。

【0013】次に、この破壊されたカルシニューリン遺伝子を制限酵素により切り出し、野性株に導入する。これにより導入された破壊されたカルシニューリン遺伝子と、野性株中のゲノム性カルシニューリン遺伝子との間に相同性組換えが起こり、野性株のゲノム性カルシニューリン遺伝子に破壊された遺伝子が導入され、この結果カルシニューリン活性を有しない酵母株、すなわち本発明における変異株が得られる。

【0014】次に、酵母用の常用の培地、例えばYPD培地（酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%）に、種々の濃度のカルシウム塩、例えば塩化カルシウムを添加し、これに野性株及び変異株を培養する。そして野性株は増殖しないが変異株は増殖するカルシウム濃度を求める。このようなカルシウム濃度は野性株（及び対応する変異株）により異なり、実験により容易に求めることができる。一例として、野性株としてYPH499株を用いる場合、600mMのCa⁺⁺濃度が上記の条件を満足する。

【0015】本発明のスクリーニング方法を実行するには、前記のようにして決定されたカルシウム、例えば塩化カルシウム、を含有する酵母培養用培地（スクリーニング用培地）に被験サンプル（免疫抑制物質候補）をある濃度（例えばμg/ml以下）で加え、これに野性株を

接種し、培養する。培養は通常の酵母用培養条件、例えば23~30℃にて2~4日間、好氣的又は嫌氣的条件下で培養する。培養は、2%寒天を含んだ培地フラスコ、試験管等を用いて行ってもよいが、マイクロタイタープレートの上で行うのが、多数の被験サンプルを同時に試験することができる等の理由から好ましい。

【0016】この培養の結果、野性株酵母が増殖すれば、被験サンプル又はそれに含有されている物質が免疫抑制物質であると推定され、野性株酵母が増殖しなければ、被験サンプル中に免疫抑制物質が含有されていなかったと推定される。なお、このスクリーニング操作において、被験サンプルを添加しない培地に野性株を接種し、該野性株が増殖しないことを確認することにより、該野性株に対する培地中のカルシウム濃度が適切であったことを確認するのが好ましい。

【0017】また、カルシウムを含有しないか又は所定の濃度より低い濃度でカルシウムを含有する培地に野性株を接種して培養し、その増殖を確認することにより、使用した野性株が適切なものであったことを確認するのが好ましい。さらに、所定の濃度のカルシウムを含有し、且つ被験サンプルが添加されていない培地に変異株を接種して培養し、その増殖を確認することにより、使用した培地が適切なものであったことを確認するのも好ましい。

【0018】簡便には次の方法によりスクリーニングを行うことができる。

培地

600mM	CaCl ₂
2%	酵母エキス
4%	バクトペプトン
4%	デキストロース（グルコース）

【0019】細胞培養液

YPD培地で30℃にて一昼夜培養した野性株（1~3×10⁸細胞/ml）の細胞培養液（又はその凍結乾燥物）

方法

（1）96穴平底タイタープレートの1穴に50μlの培地を加え、1μlの細胞培養液を添加する。

（2）検定したいサンプルを滅菌水に懸濁後、50μlを穴に加える。陽性コントロールとして、最終濃度が1μg/mlとなるようにFK506を添加し、陰性コントロールとして滅菌水を添加する。

（3）30℃で24時間、緩やかに攪拌しながら保温する。

（4）OD₅₅₀の測定。OD₅₅₀が0.2以上であれば、免疫抑制効果のある物質の可能性が高い。

【0020】前記培地（液体培地又は水を未添加の培地配合物）、及び細胞培養液（又はその凍結乾燥物）を組合わせてスクリーニング用キットにすることもできる。

【0021】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. カルシニューリンの調節サブユニット遺伝子 (CNB1 遺伝子) が破壊された株 (変異株) の作製
カルシニューリンの調節サブユニット遺伝子 (CNB1 遺伝子) のクローニングのため、Cyerら (Mol. Cell. Biol. vol. 12, 3460-3469, 1992) に記載されている塩基配列に基づいて、CNB1プライマー1及び2を合成した。合成したDNAプライマーの塩基配列を配列番号: 1及び2に示す。

【0022】このプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下、PCRと略) を行った。反応の条件は、PCR反応液 [20mM Tris-HCl (pH8.8)、2mM MgCl₂、6mM KCl、0.1% Triton X-100、0.1mg/ml Nuclease free BSA、100pmolプライマー1、100pmolプライマー2、0.2mM dNTP mix、0.15μg/mlのS288CゲノムDNA、2.5units Pfu DNAポリメラーゼ] を100μl用いて、94℃、1分間 (DNA変性)、45℃、4分間 (アニーリング)、72℃、3分間 (DNA伸長) の30サイクルとした。

【0023】アガロース電気泳動法を用いて目的のDNA断片が増幅されていることを確認した後、ガラスビーズ法を用いて目的の断片を抽出し、pGEM-Tベクター (Promega社) にクローニングした。得られたプラスミドをpCNB1と称する。

【0024】1μgのpCNB1 DNAをBsmIによる制限酵素処理をおこなってCNB1遺伝子内部を切断し、電気泳動法とガラスビーズ法を用いて約0.33kbの断片を除いた後、末端平滑化をおこない、あらかじめ末端平滑化をおこなっていたHIS3遺伝子を挿入し、CNB1遺伝子破壊用のDNA断片を含有するプラスミドpΔcnb1::HIS3を得た。なお、HIS3遺伝子はpJJ215 (Jones and Prakash, Yeast. Vol. 6, 363-366) により得たものである。

【0025】1μgのpΔcnb1::HIS3のDNAを制限酵素ApaI及びSpeIで同時に処理し、処理後のDNAを用いて、酵母菌YPH499 (Sikorski and Hieter, Genetics vol. 122, 19-27, (1989)) を形質転換し、CNB1遺伝子の破壊をおこなった。こうして得られた株をDCNB1-A株と呼ぶ。なお、CNB1遺伝子の破壊はそれぞれのゲノムDNAを単離精製後、そのDNAをテンプレートとして、PCR法を用いて確認した。

【0026】実施例2. 固体培地におけるCaCl₂による野生株の増殖抑制と、FK506によるその回復

酵母エキス (DIFCO) 1%、バクトペプトン (DIFCO) 2%、グルコース2%、及び寒天2%を含有する固体培地にさらに種々の濃度のCaCl₂を添加した培地に、野生酵母株サッカロミセス・セレビシエYPH499 (Sikorski and Hieter, Genetics Vol. 122, 19-27, (1989)) を接種し、30℃にて5日間培養した。その結果、この菌株はCaCl₂を500mM含有する培地では増殖したが、600mM含有する培地では増殖しなかった。

【0027】他方、上記の培地に1μg/mlのFK506を添加した培地を用いた場合、CaCl₂濃度500mM及び600mMのいずれにおいても野生株は増殖した。また、FK506 (1μg/ml) の代わりにCsA (50μg/ml) を使用した場合も同様の結果が得られた。この結果、600mMのCaCl₂を含有し、さらに被験サンプルを含有する酵母用固体培地に野生株YPH499を接種し、その増殖を観察することにより、被験サンプルが免疫抑制活性を有するか否かを推定することができることが明らかになった。

【0028】実施例3. 酵母エキス1%、バクトペプトン2%及びグルコース2%を含有する液体培地、又はこれに0.1μg/mlもしくは1μg/mlのFK506を添加した培地をタイタープレートのウェルに100μlづつ入れ、これに野生株YPH499を約1×10⁵細胞/ウェルの量で接種し、30℃にて24時間振とう培養し、マイクロプレートリーダーによりOD600測定した。この結果を図1に示す。

【0029】図1から明らかなように、野生株YPH499は、液体培地において200mMのCaCl₂の存在下では増殖したが、300mMのCaCl₂の存在下では増殖が阻害された。しかしながら、0.1μg/ml又は1μg/mlの免疫抑制物質FK506の存在下では300mMのCaCl₂の存在下で増殖が観察された。従って、CaCl₂の培地中濃度を300mMとすることにより、液体培地においても免疫抑制物質のスクリーニングが可能であることが明らかになった。

【0030】実施例4. つぎに、FK506が直接、酵母細胞の細胞膜のカルシウム透過性を変化させてカルシウム耐性を増加させているのか、或はFK506が細胞質内のFK506受容体 (以下、FKBP-12と略) と結合し、その複合体がカルシニューリンを阻害することによっておこった現象なのかを調べるために、FKBP-12をコードしているFKB1の遺伝子破壊株、DF1株、及びカルシニューリンの調節サブユニットの遺伝子破壊株、DCNB1-A株、を用いて、YPD+6.00mM CaCl₂培地におけるFK506の有無による増殖の変化を調べた。

【0031】その結果、DF1株においてはFK506の有無にかかわらず、YPD+6.00mM CaCl₂培

地中では増殖しない。つまり、FK506はFKBP-12が欠損した株においては、FK506によるカルシニューリンの阻害が起こらないために増殖できなかった。DCNB1-A株においてはカルシニューリンが活性を持たないためにFK506の有無にかかわらず増殖した。以上の結果から、FK506は酵母細胞内のFKBP-12と複合体を形成し、カルシニューリンを阻害することにより、YPD+600mM CaCl₂ 培地における細胞の増殖を可能にすることが示された。

【0032】

【発明の効果】以上の通り、本発明によれば、所定の濃度のカルシウムを含有する培地に被験サンプルを添加 *

配列

ACTTGGAAC TCAATGGTC

【0034】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

CTTATTGTTT GTTACATATA C

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は培地中のCaCl₂濃度及びFK506★

*し、該培地中で野性株酵母（カルシニューリン遺伝子が欠損していない酵母株）を培養し、その増殖の有無を観察することにより、極めて簡単に免疫抑制物質のスクリーニングを行うことができる。

【0033】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

19

※鎖の数：1本鎖

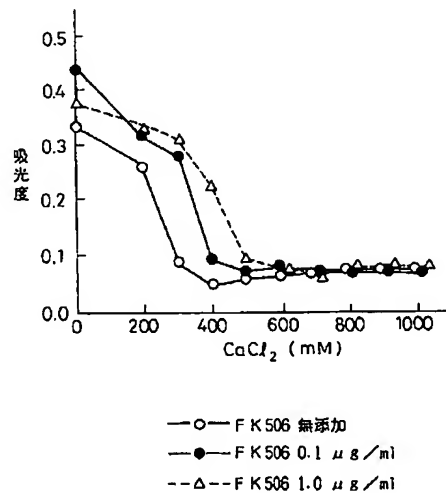
トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

21

20★濃度と野性株酵母（カルシニューリン活性株）の増殖との関係を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 安楽 泰宏

東京都杉並区上荻2-21-9